

表2 回収率に及ぼす透析用溶液のメタノール濃度の影響

試料	メタノール濃度(%)	回収率 (%)										
		SA	EA	SoA	DHA	P-Me	P-Et	P-iP	P-Pro	P-iB	P-Bt	
ピーナツバター	0	-	95.0	94.8	95.4	82.4	65.6	48.6	41.8	23.6	21.2	
	30	-	97.0	96.5	94.3	91.2	75.9	63.0	57.2	38.7	36.2	
	50	-	96.3	93.0	96.2	99.8	88.4	84.3	81.9	73.4	71.6	
	80	84.0	101	98.6	96.8	99.8	99.0	99.0	98.6	96.6	96.1	
ロールケーキ	0	-	99.0	93.5	98.2	91.5	73.7	55.6	44.7	24.2	21.6	
	30	-	101	101	97.5	101	99.6	92.9	88.2	72.1	68.6	
	50	-	99.0	99.2	98.8	98.8	99.6	96.9	96.6	93.5	93.0	
	80	107	103	95.5	93.1	100	99.3	97.7	97.3	95.1	102.0	

-: 検出していない

表3 各種食品からの保存料の添加回収率

試料	回収率 (%)										
	SA	BA	SoA	DHA	P-Me	P-Et	P-iP	P-Pr	P-iB	P-Bt	
しょう油	85.0±1.1	96.9±1.1	93.5±0.6	89.5±3	97.0±3.4	94.8±3.3	81.4±7.4	87.3±3.3	79.9±3.2	81.5±1.1	
ロールケーキ	107±0.7	103±1.5	95.5±1.2	93.1±2.8	100±1.7	99.3±1.8	97.7±2.2	97.3±2.4	95.1±3.0	102±6.4	
チーズ	71.8±2.0	96.3±4	98.4±3.7	77.7±3.2	108±5.0	107±5.4	105±5.6	105±5.6	102±6.2	101±6.4	
ロースム	101±1.2	96.1±3.7	98.7±3.2	83.2±3.2	105±4.0	105±4.4	102±5.1	104±4.9	100±5.6	101±5.6	
マヨネーズ	109±0.4	98.7±0.8	102±3.1	96.3±0.9	104±1.9	102±2.1	99.5±2.2	99.1±2.2	95.3±2.1	95.2±2.9	
ピーナツバター	84.0±3.8	101±2.0	98.6±1.2	96.8±2.0	99.8±1.0	99.0±1.9	99.5±1.7	98.3±1.2	96.6±1.6	96.1±1.6	

数値は平均値±SD (N=3)

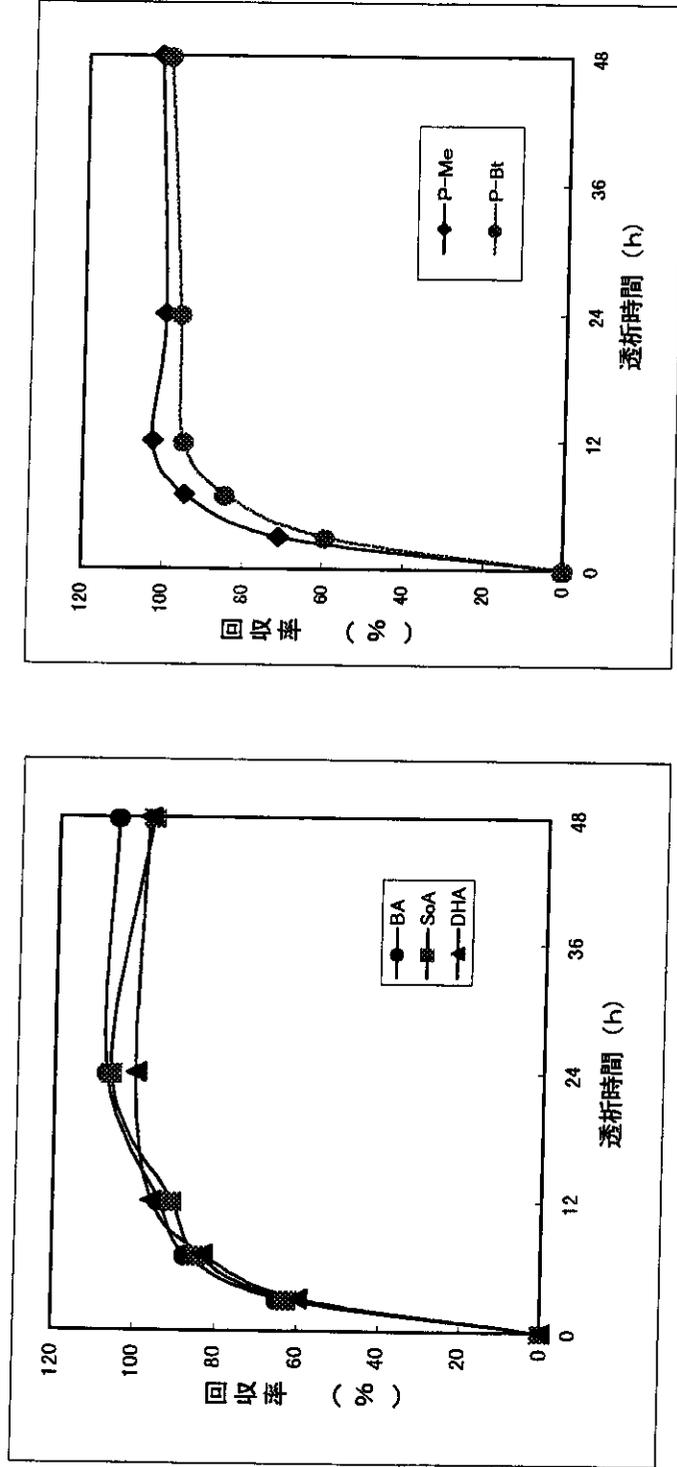


図1 回収率に及ぼす透析時間の影響 試料: ピーナツバター

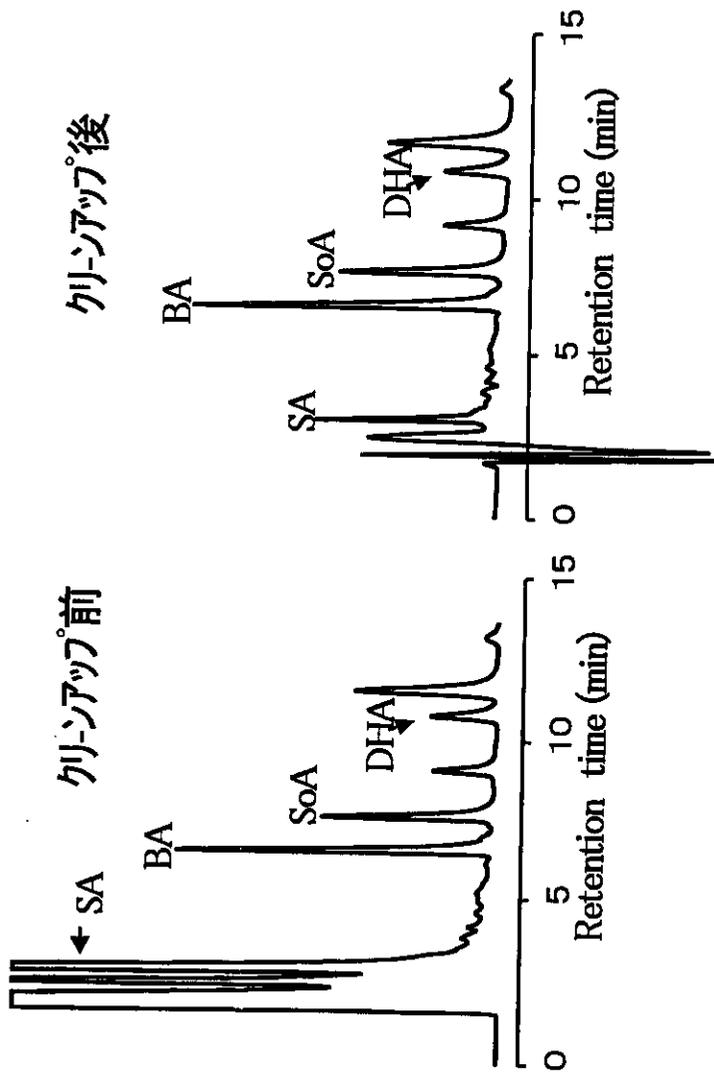


図2 カートリッジカラム処理によるクリーニングアップ効果 試料：しょう油

## 2) 溶媒抽出法による食品中の保存料の分析法

### B. 研究方法

#### 1. 試料及び試液

市販の醤油，ワイン，マーガリン，チーズ，ケチャップ及びマカデミアチョコレートを用いた。

#### 2. 試薬

安息香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸，サリチル酸，クエン酸，ジエチルエーテル，硫酸，塩酸及びアンモニア水：和光純薬工業（株）製特級試薬を使用した。

蒸留水，メタノール及びアセトニトリル：関東科学（株）HPLC用試薬

5 m mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.0) : クエン酸一水和物 7.0 g とクエン酸三ナトリウム二水和物 6.0 g を水に溶解し 1000 ml とし，用時，10 倍に希釈した。

多孔性ケイソウ土カラム：VARIAN 社製 ケムエルト CE1020 を使用した。

逆相系ミニカラム：Waters 社製 OASIS HLB(60 mg) を使用した。

#### 3. 試験溶液の調製

##### 3-1) 精製用試験溶液の調製

試料 10g または 10 ml を塩化ナトリウム 10 g 及び蒸留水 30 ml を加え，10% 硫酸で強酸性とし，ジエチルエーテル 70 mL を加えて 5 分間ホモジナイズした。エーテル層を分取後，水層にエーテル 50 ml を加え，同様の操作を 2 回繰り返した。エーテル層を合わせ，無水硫酸ナトリウムを加えて，時々振り混ぜながら 30 分間放置後，ろ

紙を用いてろ過した。ろ液を減圧濃縮し，更に窒素気流下で溶媒を除去した。残さにエーテルを加えて溶解し 20 mL の定容として精製用試験液とした。

#### 4. 分析用試験液の調製

精製用試験液 4 mL の溶媒を除去し，残さに 0.5 mol/L 塩酸 4 mL を加え超音波を用いて懸濁し，多孔性ケイソウ土カラムに負荷した。0.5 mol/L 塩酸 2 mL で 2 回洗浄し，5 分間放置後，0.5 mol/L 塩酸・メタノール (2:98) 100 mL で安息香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸及びサリチル酸を溶出した。溶出液をおよそ 5 ml まで濃縮し，5 mol/L アンモニア水で中和した後，5 mol/L クエン酸緩衝液で 10 ml に定容し，HPLC 分析用試験液 (A) とした。

更に，サリチル酸を定量する場合，先に得られた分析用試験液 (A) より，2 mL を予めメタノール及び 5 mol/L クエン酸緩衝液で洗浄した逆相系ミニカラムに負荷し，負荷液をすて，ミニカラムを水 1 mL で洗浄後，通気して乾燥させ，メタノール 4 mL で 4 種の保存料を溶出した。この溶出液を減圧濃縮し，窒素気流下で溶媒を除去した残さに 5 mol/L クエン酸緩衝液 2 mL を加えて溶解し，HPLC 用試験溶液 (B) とした。

#### HPLC 条件

カラム：東ソー TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm x 150 mm)

移動相：メタノール / アセトニトリル / クエン酸緩衝液 = 18:12:70

カラム温度：40 °C

流速：1 mL/min

測定波長：240 nm

### C. 結果及び考察

多孔性ケイソウ土カラムの検討  
精製用試験溶液を直接多孔性ケイソウ土カラムに負荷すると食品中の脂肪の除去が不十分であった。これはエーテルに溶けている脂肪、油分がケイソウ土に保持されず、溶出溶媒とともに溶出されることに依るものと考えられた。そこで、負荷前にエーテルを留去し、残さを0.5 mol/Lの塩酸に超音波を用いて懸濁させ、カラムに負荷した。溶出液として、メタノール、水・メタノール(2:98)及び0.5 mol/L塩酸/メタノール(2:98)を検討したところ、0.5 mol/L塩酸・メタノール(2:98)が食品中からの夾雑物の除去並びに保存料の溶出率が良かった。0.5 mol/L塩酸を溶出に用いることにより、ケイソウ土に保持された食品中の脂肪等が溶出されにくいと考えられた。

#### 逆相系ミニカラムの検討

食品中の安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸はエーテル抽出後、多孔性ケイソウ土カラムによる精製で分析が可能であった。しかし、サリチル酸はHPLCによる保持時間が小さく、食品中の夾雑物との分離が不十分であった。そこで、HPLC用試験溶液(A)の精製をOasis HLBで試みたところ図1に示すように食品中の去雑物との分離が可能となった。

#### 添加回収実験

試料とした、醤油、ワイン、マ

ーガリン、チーズ、ケチャップ及びマカデミアンチョコレートに各保存剤が5 ppm及び50 ppmになるように添加し回収試験を行った。その結果を表1に示した。各試料並びに保存剤において良好な回収率が得られた。

#### 市販食品中の保存剤の分析

本法を用い市販食品中の保存剤を定量分析したところ、醤油、ワイン、チーズにおいてサリチル酸に近似したピークが検出された。このためGC-MSによる確認を行ったところ、ワイン及びチーズで検出されたピークはサリチル酸ではなかった。しかし、醤油ではサリチル酸が確認され、3 ppmのサリチル酸の含有が明したが、保存料として効果のある濃度に比べ極めて低濃度であることから、天然由来と考えられる。また、チーズにおいて使用が許可されていない安息香酸が検出されたが、これは、原料乳中に存在する馬尿酸より生成したものと考えられる<sup>2)</sup>。

### D. 結論

食品中の安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸及びサリチル酸を溶媒抽出し、ケイソウ土カラム並びに逆相系ミニカラムにより精製後、HPLCで定量する分析法を開発した。

### E. 文献

1. 日本薬学会編：衛生試験法・2000, 286-288, 2000, 金原出版
2. 栗崎純一, 笹子謙治, 津郷友吉, 山内邦夫：食衛誌, 3, 14, 25,

(1973)

表1

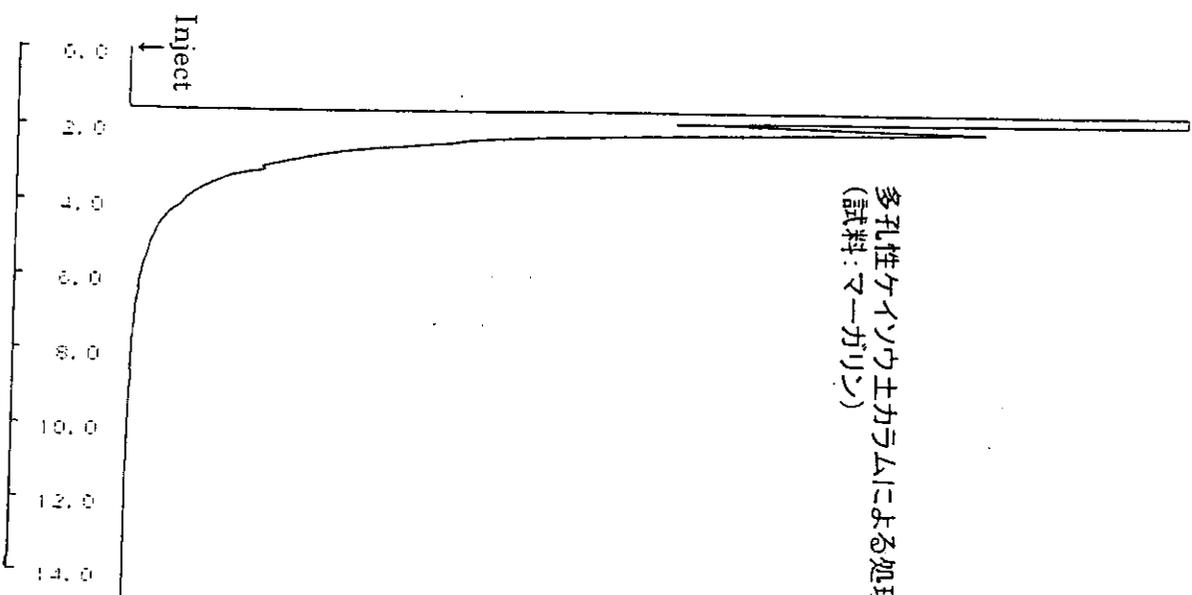
## 安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸及びサリチル酸の添加回収試験

食品	添加量 (ppm)	回収率(%)			
		安息香酸	ソルビン酸	デヒドロ酢酸	サリチル酸
しょう油	5	88	76	85	78
	50	95	88	91	77
ケチャップ	5	93	74	72	74
	50	89	75	82	77
マーガリン	5	86	76	76	74
	50	86	80	81	75
チーズ	5	81	74	79	75
	50	84	75	79	74
ワイン	5	84	77	76	75
	50	87	78	82	81
マカデミアチョコレート	5	85	76	75	75
	50	86	80	82	77

注)それぞれ3回試行の平均値。

サリチル酸については、OasisHLBミニカラムによる処理を行った。

多孔性ケイソウ土カラムによる処理  
(試料: マーガリン)



多孔性ケイソウ土カラム+ミニカラムによる処理  
(試料: マーガリン)

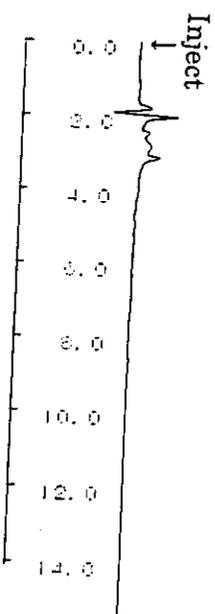
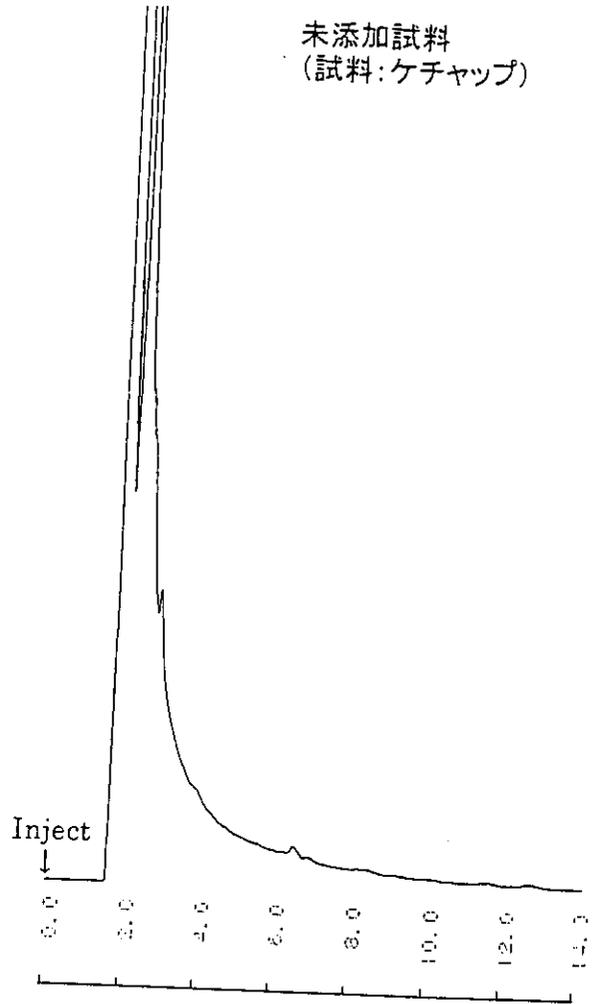
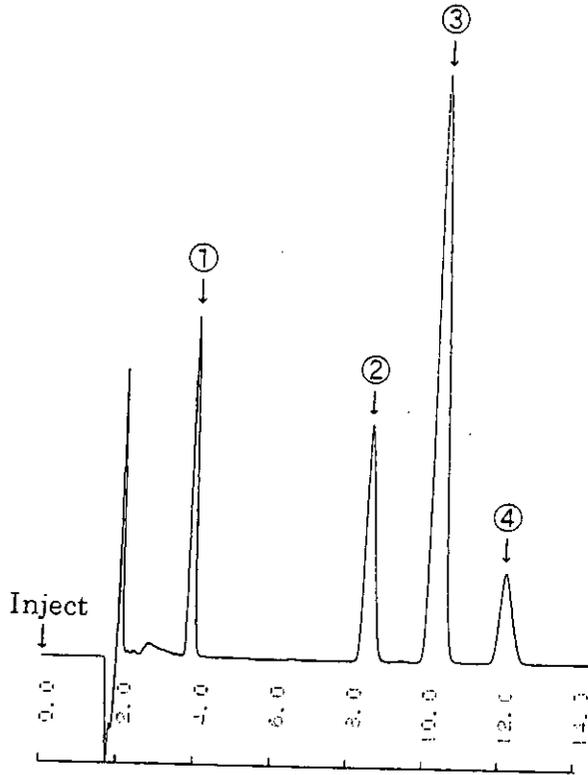


図1) ミニカラムによる精製効果を示すクロマトグラム

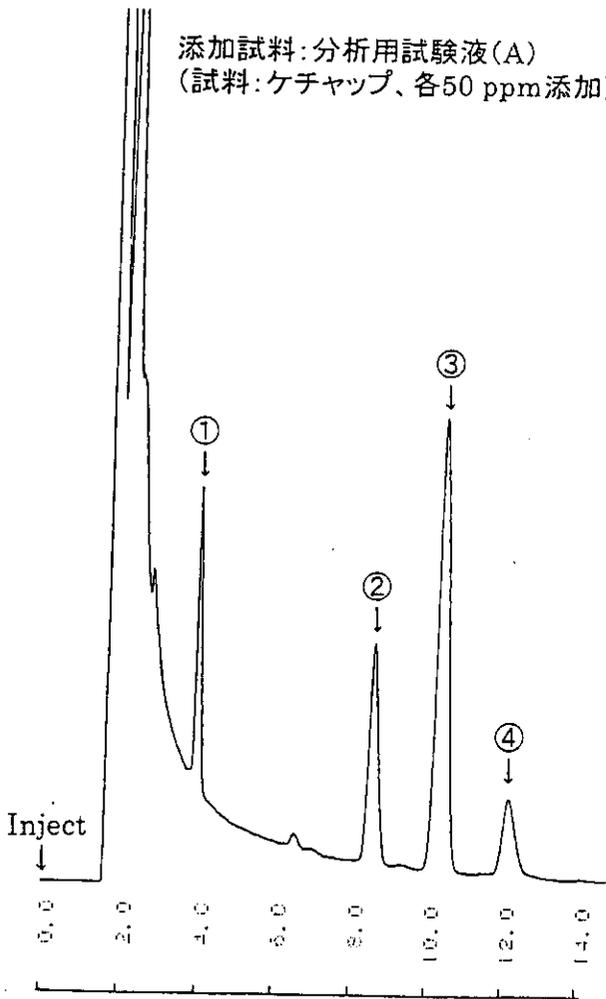
標準品:各10 ppm

- ①サリチル酸
- ②安息香酸
- ③ソルビン酸
- ④デヒドロ酢酸

未添加試料  
(試料:ケチャップ)



添加試料:分析用試験液(A)  
(試料:ケチャップ、各50 ppm添加)



添加試料:分析用試験液(B)  
(試料:ケチャップ、各50 ppm添加)

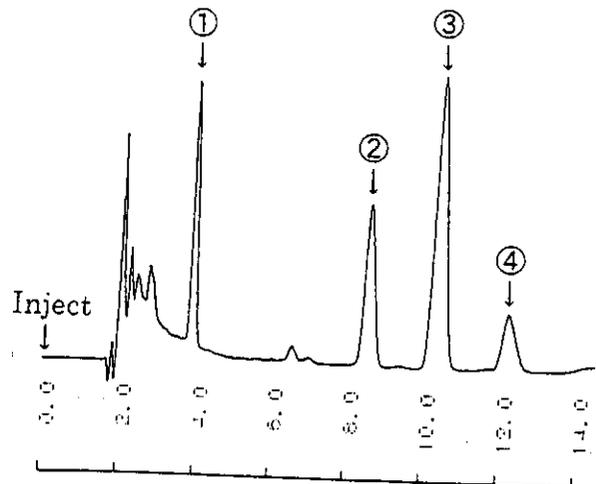


図2) 添加回収試験のクロマトグラム

## II. 輸入食品中の着色料について

### A. 研究目的

既存添加物名簿に記載されているコチニール色素はサボテン等に寄生する、カイガラムシ科のエンジムシ(*Coccus cacti* L.)の乾燥体より、水またはエタノールで抽出して得られ、主色素はアントラキノン系のカルミン酸であり、カルミン酸のアルミニウムレーキであるカルミン或いは重合等の化学的処理が行われた場合は未許可添加物となる。しかし、カナダ等多くの国ではカルミン酸、カルミンともに許可色素であり、輸入食品にコチニール色素と表示されている場合、未許可添加物であるカルミン或いはカルミン酸の化学的処理が行われた色素が使用されている可能性もある。一方、カルミン酸を主原料とし、酸安定性のカルミン色素(Acid stable carmine)が米国の特許公報に記載されている。

輸入食品中の未確認色素について抽出、精製法を検討し、TLCのR<sub>f</sub>値並びにHPLCによる保持時間、スペクトルデータから当該色素の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 試料及び試薬

カナダ産アップルシロップ及び油料検定協会より入手したアップルシロップに使用された色素製剤  
カルミン酸はメルク社製、カルミン(カルミン酸アルミニウムレーキ)はシグマ社製その他の試薬は市販特級品を用いた。

タール色素の食用赤色 2号, 3号, 40号, 102号, 104号, 105号, 106

号は国立医薬品食品衛生研究所標準品, 未許可色素のアゾルビン, ファーストレッド, ポンソー SX, ポンソー R, ポンソー 3R, ポンソー 6R は和光純薬社製, 天然色素のアナトー, コーン, ビートレッド, コウリヤン, ベリー類, 赤キャベツ, ラック, シソ, ブドー果汁, コチニール色素は三栄源 FFI 製を用いた。

#### 2. HPLC 条件

[分析]

カラム: YMC-ODS-L80 (250x4.6 i.d. mm)

カラム温度: 40 °C

移動相: 2% 酢酸 / アセトニトリル = 85/15

流速: 1ml/min.

[分取]

カラム: YMC-ODS-L80 (250x20 i.d. mm)

カラム温度: 40 °C

移動相: 2% 酢酸 / アセトニトリル = 80/20

流速: 7ml/min.

#### 3. TLC 条件

1. 担体: ケイソウ土, 展開溶媒: 酢酸エチル:メタノール:28%アンモニア = 2:1:1

2. 担体: HP-セルロース, 展開溶媒: アセトン:イソアミルアルコール:水 = 6:6:5, n-ブタノール:エタノール:1%アンモニア = 6:2:3

3. 担体: RP-18W, 展開溶媒: メタノール:0.5mol シュウ酸 = 55:45

#### 4. 試験溶液の調製

輸入アップルシロップ（カナダ産）10.0 gに水 20 ml 並びに合成吸着剤ハイポラスポリマー HP-20 樹脂 2 gを加え穏やかに攪拌した。予め，HP-20を高さ約 5 cmに充填した内径 1 cm のカラムに上積し，水 100 mlを流して，シロップ中の糖分等を除去した。次いで，メチルアルコール 50 mlを流し，溶出液を減圧下で濃縮乾固後，メタノール 0.5 mlを加え溶解し，TLC及び HPLC用試験溶液とした。

#### 5. 酸加水分解

HPLC用試験溶液 0.2 mlのメタノールを留去し，2 mol/L塩酸 0.5 mlを加え，またカルミン 1 mg/mlの 2 mol/L塩酸溶液 0.5 mlを沸騰水浴中で1時間加熱した。

#### 6. Acid stable carmineの合成

U.S特許公報<sup>1)</sup>に準じ，カルミン酸 0.3 g，クエン酸 0.36 g，28%アンモニア 1 mlに水 0.36 mlを加え 115-120 °Cで 70分間還流した。反応終了後，溶媒を留去し，反応混合物を分取 HPLCで分画し，主色素成分を単離した。

#### C. 結果

アップルシロップから検出された色素は TLCの Rf値から合成タール色素及び天然色素のアナトー，コーン，ビートレッド，コウリヤン，ベリー類，赤キャベツ，ラック，シソ，ブドー果汁，コチニール色素には該当しなかった。また，本品にはコチニール色素使用の表示があり，カルミン酸及び

カルミン酸のアルミニウムレーキであるカルミンが考えられた。カルミンの食品中からの分析法に確立された方法はないが，アルミニウムレーキである為，酸加水分解によりカルミン酸が生成する<sup>2)</sup>試験溶液及び試薬のカルミンを塩酸酸性で加水分解し，HPLCで検討したところ，カルミンは完全にカルミン酸に変化したのに比べ，アップルシロップ中の着色料は酸加水分解に対して非常に安定であり，加水分解前と変化がなかった。そこで，米国の特許公報に記載されているカルミン酸を原料とした Acid stable carmineを合成し，精製後 HPLCで分析した。その結果，アップルシロップ中の着色料は保持時間，吸収スペクトル共に Acid stable carmineと合致した（図 1-3）。また，TLCの Rf値も同じであった。

#### D. 考察

食品中の食品添加物分析法<sup>3)</sup>ではポリアミドカラムを用い，アンモニア・エタノール溶液で着色料の溶出を行っている。今回対象となった着色料は酸加水分解に安定であり，米国の特許公報による色素の可能性があった。この色素はアンモニアとカルミン酸から合成されており，ポリアミドカラムによる分離，精製では着色料の抽出，単離の操作中に当該色素が生成される可能性が考えられるため，アンモニア溶液を使用しない分離カラムを検討した。その結果，HP-20はメタノールのみで色素の溶出が可能であり本色素の単離に有効で

あると考えられた。

輸入食品中に使用されている未許可の着色料はわが国以外の国で許可になっている色素のみでなく、新たに開発、使用されていると考えられ、今後の輸入食品検査にとって検討課題であると思われた。

#### E. 結論

輸入アップルシロップ中の未確認着色料は HPLC の保持時間，スペクトルデータ及び TLC の Rf 値から，米国の特許公報に従って合成した Acid stable carmine であることが明らかになった。

#### F. 文献

1. Schul., U.S.Patent 5147673 ( Sep. 15.1992)

2. 岸弘子、川名清子、谷孝之：  
第 36 回全国衛生化学技術協議会  
年会 講演集 p.100-101 (1999)

3. 厚生省生活衛生局食品化学課  
監修：第 2 版 食品中の食品添加物分析法 p.113-118 (2000)

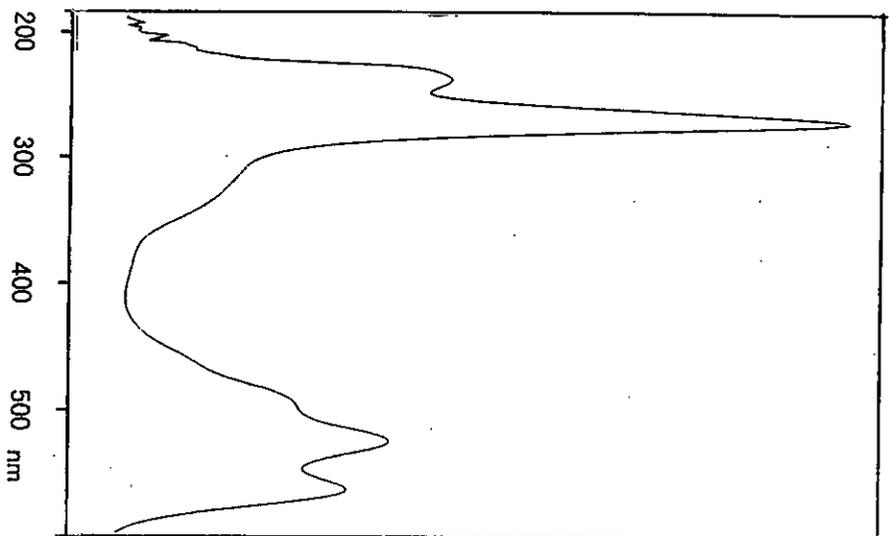
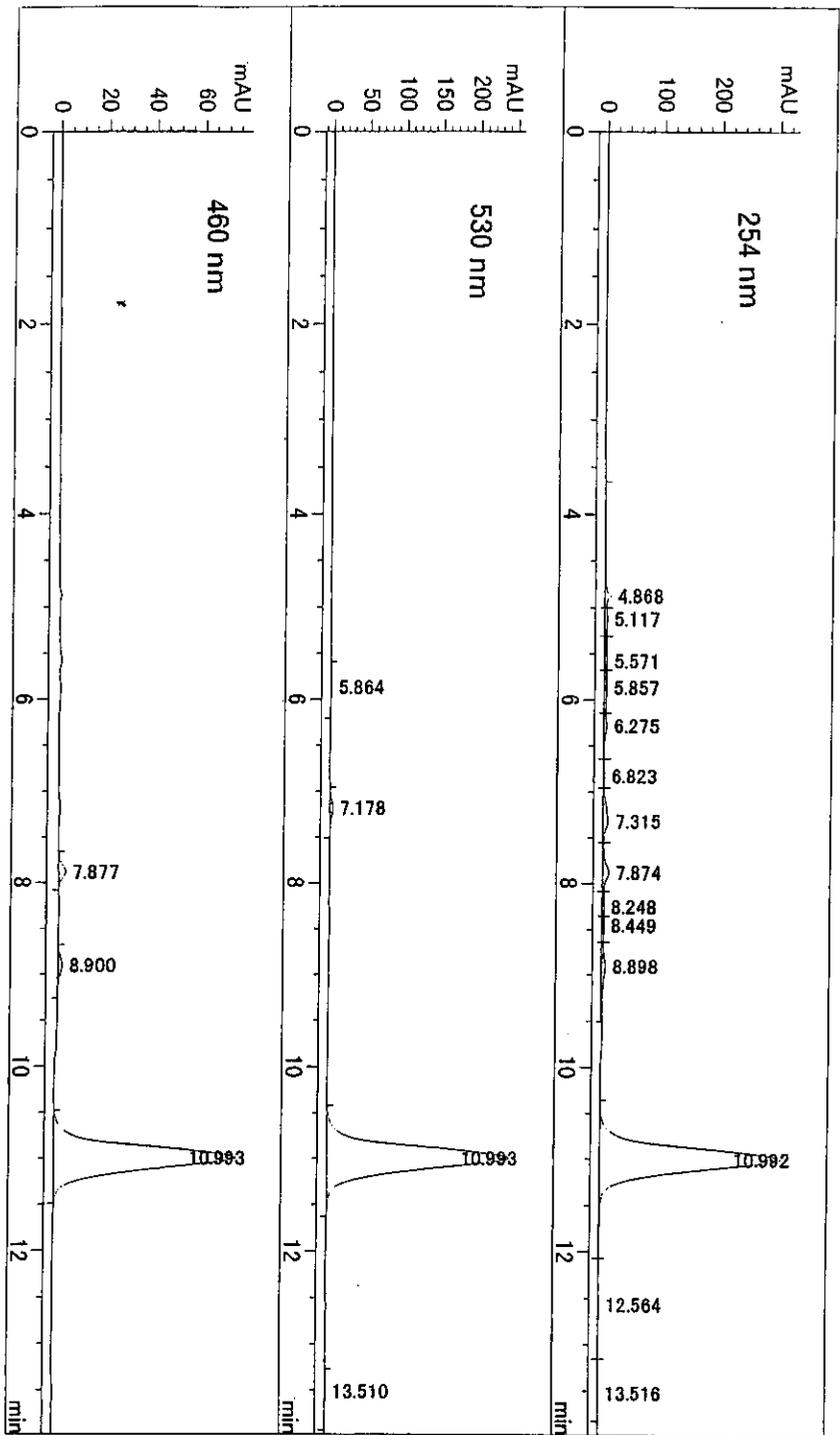


図 1. アツアルシロツク中の着色料の HPLC 及び保持時間 10.99 分のピークのスペクトル

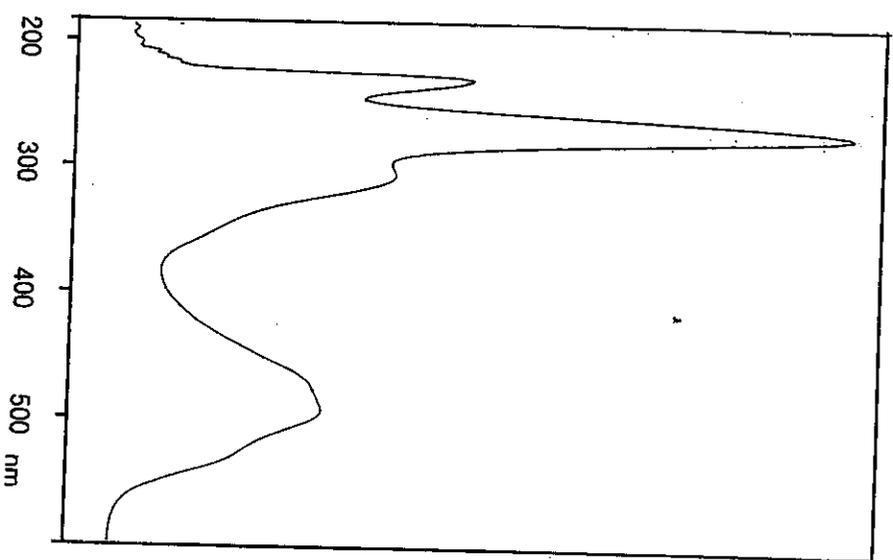
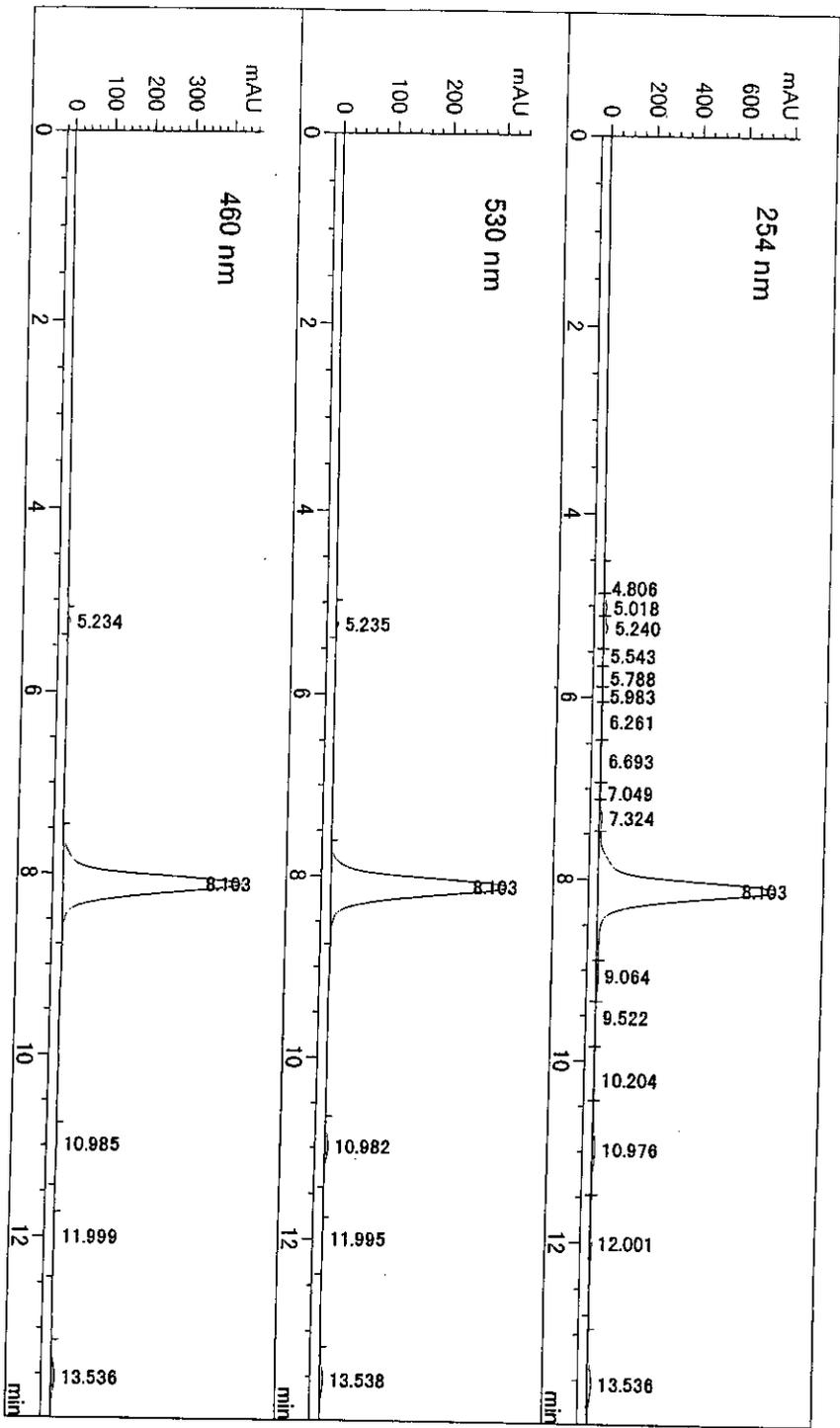


図 2. カルミン酸の HPLC 及び保持時間 8.10 分のピークのスペクトル

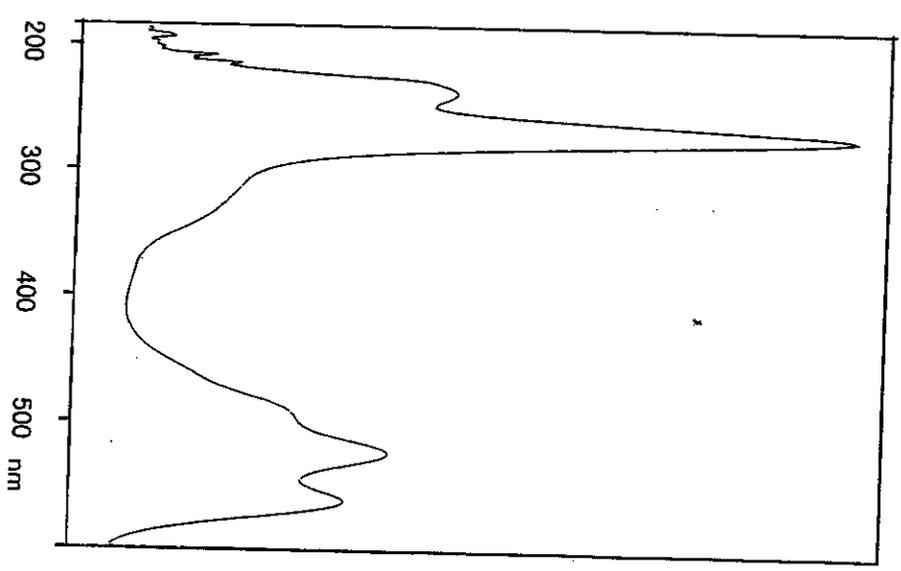
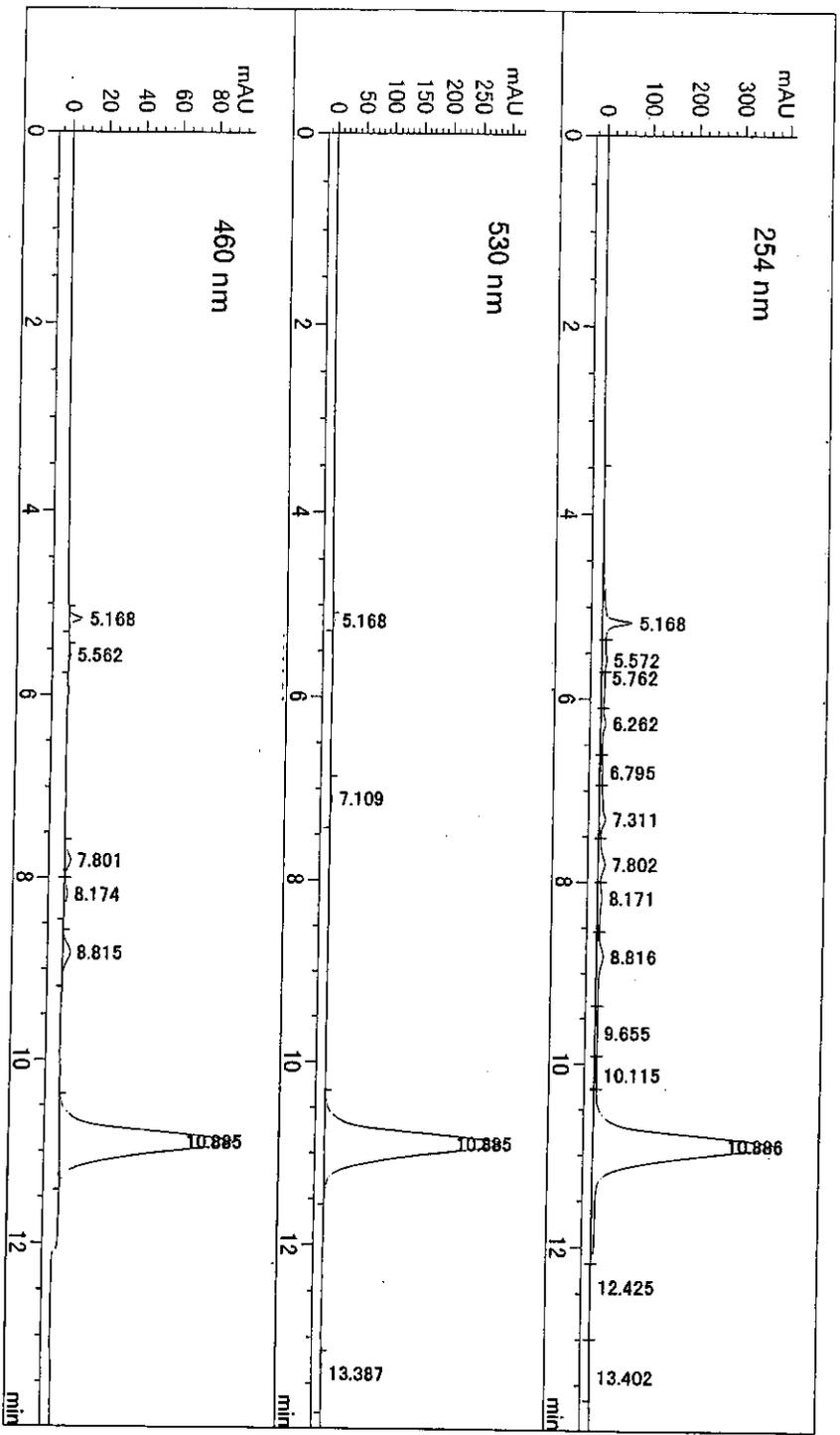


図 3. 合成した色素の HPLC 及び保持時間 10.88 分のピークのスペクトル

平成12年度厚生科学研究

「食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究」

## 分担報告書

「生産統計を基にした食品添加物の摂取量の推定」

平成13年3月31日

分担研究者 神戸学院大学 薬学部  
教授 藤井 正美

## 調査及び調査結果

本食品添加物生産・流通調査は、日本国内の食品添加物製造所に調査表を送付し、食品添加物原体（食品添加物の文字が表示されていて出荷されるもの、自家消費されたもの）の種類・生産・販売・使用についての量的調査である。

本調査では、指定添加物（食品衛生法施行規則 別表第 2 に掲げられている添加物）について平成 10 年度の実施を対象に平成 11 年度に初年度調査を行った。平成 12 年度は前年度の未回答を主に再度アンケート調査を行い、また内容について疑義のあるものを研究班員が手分けして質問し、これを明確化した。

平成 12 年度の再回答発送数は 119 社、内訳は日本添加物協会会員 40 社、非会員 79 社で、その結果回収はそれぞれ 32（80%）、30（38%）、計 62 社（52.1%）で指定添加物の取り扱いありとした会社は 35 社であった。

その結果平成 11～12 年度を通じ、調査表の発送 計 463 社 回答 412 社（89%）、そのうち 282 社（回答社数の 68%）が指定添加物の取り扱いがあるとされた。回収率は過去最高（前回 78%）、回答中の指定添加物取扱社数からみて、未回答の 51 社（11%）のほとんどは指定添加物を扱っていないか、食品添加物の販売業と思われる。

この統計データを用い、次年度 加工食品統計等を用い、純食品向け添加物提供量を求め、1 日 1 人平均食品添加物摂取量を計算する。

修正調査結果は、資料として以下の順に整理してある。

- (1) 食品添加物名別 製造会社名、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量分類集計表
- (2) 食品添加物製造及び輸入業者名別 食品添加物名、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ
- (3) 食品添加物用途別 食品添加物名、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ
- (4) 食品添加物名別 食添以外用途調べ

# 調査対象食品添加物一覧表

2001年3月31日

( 1)	1	グルコン酸亜鉛
( 2)	1-2	硫酸亜鉛
( 3)	2	亜塩素酸ナトリウム
( 4)	3	アジピン酸
( 5)	4	亜硝酸ナトリウム
( 6)	5	L-アスコルビン酸
( 7)	6	L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル
( 8)	7	L-アスコルビン酸ナトリウム
( 9)	7-2	L-アスコルビン酸ハルミチン酸エステル
(10)	8	L-アスパラギン酸ナトリウム
(11)	9	アスパルテーム
(12)	10	アセチルリシノール酸メチル
(13)	11	アセト酢酸エチル
(14)	12	アセトフェノン
(15)	13	アセトン
(16)	14	アニスアルデヒド
(17)	15	$\alpha$ -アミルシンナムアルデヒド
(18)	16	DL-アラニン
(19)	17	亜硫酸ナトリウム (結晶)
(20)	18	亜硫酸ナトリウム (無水)
(21)	19	L-アルギニンL-グルタミン酸塩
(22)	20	アルギン酸ナトリウム
(23)	21	アルギン酸フ°ロビ°レンク°リコールエステル
(24)	22	安息香酸
(25)	23	安息香酸ナトリウム
(26)	24	アントラニル酸メチル
(27)	25	アンモニア
(28)	26	イオノン
(29)	27	イオン交換樹脂
(30)	28	イソオイゲノール
(31)	29	イソ吉草酸イソアミル
(32)	30	イソ吉草酸エチル
(33)	31	イソチオシアネート類
(34)	32	イソチオシアン酸アリル
(35)	33	L-イソロイシン
(36)	34	5'-イイノシン酸二ナトリウム
(37)	34-2	イマザリル
(38)	35	インドール及びその誘導体
(39)	36	5'-ウリジル酸二ナトリウム
(40)	37	γ-ウンデカラクトン
(41)	38	エステルガム
(42)	39	エステル類
(43)	40	エチルバニリン
(44)	41	エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム
(45)	42	エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム
(46)	43	エーテル類
(47)	44	エリソルビン酸
(48)	45	エリソルビン酸ナトリウム
(49)	46	エルゴカルシフェロール
(50)	47	塩化アンモニウム
(51)	48	塩化カリウム
(52)	49	塩化カルシウム
(53)	50	塩化第二鉄
(54)	51	塩化マグネシウム
(55)	52	塩酸
(56)	53	オイゲノール
(57)	55	オクタナール
(58)	56	オクタニル酸エチル
(59)	57	オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウム
(60)	58	オレイン酸ナトリウム
(61)	59	過酸化水素
(62)	60	過酸化ベンゾイル
(63)	61	ガゼインナトリウム
(64)	62	過硫酸アンモニウム
(65)	63	カルボキシメチルセルロースカルシウム
(66)	64	カルボキシメチルセルロースナトリウム
(67)	65	$\beta$ -カロテン
(68)	66	ギ酸イソアミル
(69)	67	ギ酸ガラニル
(70)	68	ギ酸シトロネリル
(71)	69	5'-グアニル酸二ナトリウム
(72)	70	クエン酸 (結晶)
(73)	71	クエン酸 (無水)
(74)	72	クエン酸イソプロピル
(75)	72-2	クエン酸一カリウム
(76)	72-2	クエン酸三カリウム
(77)	73	クエン酸カルシウム
(78)	74	クエン酸第一鉄ナトリウム
(79)	75	クエン酸鉄
(80)	76	クエン酸鉄アンモニウム
(81)	77	クエン酸三ナトリウム
(82)	78	グリシン
(83)	79	グリセリン